مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد نوزدهم، شماره اول، ۱۳۹۱
http://jopp.gau.ac.ir

مهندسی ژنتیک نخود (*Cicer arietinum* L.) به‌منظور بهبود کیفی پروتئین دانه

*نسرین مشتاقی[۱]، عبدالرضا باقری[۱]، مختار جلالی جواران[۲] و بهزاد قره‌یاضی[۳]

[۱]عضو هیات‌علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۲]عضو هیات‌علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، [۳]عضو هیات‌علمی موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲

چکیده

پروتئین دانه بقولات از نظر اسیدآمینه‌های سولفوردار نظیر متیونین و سیستئین کمبود داشته و بنابراین بهبود کیفیت پروتئین حبوبات یکی از اهداف اصلاحی موردنظر در این گیاهان است. به همین منظور در این بررسی از ژن گزارشگر *gus* جهت تعیین درصد تراریزش و بیان ژن، از ژن پروتئین دانه آفتابگردان (*ssa*) برای تولید پروتئین‌های غنی از سیستئین و متیونین و از ژن گزینشگر *bar* برای گزینش گیاهان تراریخته در گیاه نخود استفاده شد. تجزیه و تحلیل PCR به‌منظور تایید تراریزش گیاهان تراریخته بالقوه به‌دست آمده در گلخانه انجام شد. فعالیت *gus* نیز در طی پنج مرحله ارزیابی شد. براساس نتایج به‌دست آمده ژن گزینشگر *bar* برای حصول گیاهان تراریخته و درصد تراریزش بالا و با سرعت زیاد در گیاه نخود مطلوب است. نتایج تجزیه و تحلیل PCR نشان داد که ۱۳ گیاه استقرار یافته در گلخانه حاوی ژن‌های *gus*، *bar* و *ssa* بوده‌اند ولی در برخی از آن‌ها ژن *gus* بیان نشده و یا بیان ضعیفی داشته است. درصد تراریزش در این آزمایش ٤/۳ درصد بود. یکی از علل پایین بودن آن مشکل ریشه‌زایی و استقرار شاخه‌ها در گلخانه می‌باشد که با جایگزینی روش پیوندزدن به جای روش ریشه‌زایی در محیط این ویترو می‌توان درصد تراریزش را نیز افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: نخود، تراریزش، اسیدآمینه‌های سولفوردار، gus و ssa

*مسئول مکاتبه: moshtaghi@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

افزایش کیفیت پروتئین دانه حبوبات از اهداف اصلاحی بسیاری از محققان علوم گیاهی می‌باشد. حبوبات از نظر داشتن برخی اسیدآمینه‌های سولفوردار نظیر متیونین و سیستئین کمبود داشته و بنابراین افزایش تولید این اسیدهای آمینه در حبوبات با کمک منابع خارجی و انتقال ژن می‌تواند باعث بهبود ارزش تغذیه‌ای حبوبات گردد. پروتئین دانه آفتابگردان (SSA[1]) و همچنین غلات از نظر داشتن این اسیدآمینه‌ها غنی هستند و بنابراین انتقال ژن‌های مرتبط با آن‌ها به حبوباتی نظیر نخود می‌تواند به تولید این اسیدآمینه‌ها در نخود کمک نماید (هیگینز و همکاران، ۱۹۸۸). مولویگ و همکاران (۱۹۹۷) از این ژن برای افزایش کیفیت پروتئین در نخودفرنگی استفاده کرده‌اند و افزایش تولید اسیدآمینه‌های سولفوردار را تایید نموده‌اند.

در مهندسی ژنتیک برای ردیابی و ظهور انتقال ژن به گیاهان تراریخته از ژن‌های گزارشگر و گزینشگر مناسب استفاده می‌شود. ژن باکتریایی *uidA* آنزیمی به نام بتاگلوکورونیداز (*gus*) را رمز می‌کند که از آن به‌عنوان یک ژن گزارشگر برای بررسی بیان ژن در گیاهان استفاده می‌شود. آنزیم بتاگلوکورونیداز ترکیب گلوکورونید را شکسته و منجر به ایجاد یک واکنش رنگی (آبی) قابل رویت می‌شود (پورویت، ۲۰۰۳). در ارتباط با ژن‌های گزینشگر نیز، علاوه‌بر ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، از ژن‌های مقاومت به علف‌کش نظیر ژن *bar* به‌عنوان ژن‌های نشانگر گزینشگر استفاده می‌شود. علف‌کش‌های غیرانتخابی نظیر بیالافوس، فسفینوتریسین و گلوفوزینات آمونیوم مانع از تولید آنزیم گلوتامین سنتتاز[2] (Gs) در گیاه می‌شوند. این آنزیم برای اسیمیلاسیون آمونیاک و تنظیم متابولیسم نیتروژن در گیاهان ضروری است. جلوگیری از تشکیل این آنزیم منجر به تجمع آمونیاک در سلول‌های گیاه و در نهایت مرگ آن‌ها می‌شود (باقری و همکاران، ۲۰۰۷). تاکنون در مطالعات متعددی که به‌منظور تولید نخود تراریخته انجام گرفته است به‌طورعمده از ژن نشانگر مقاوم به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (سرما و همکاران، ۲۰۰٤؛ سانیال و همکاران، ۲۰۰۵) و به ندرت از ژن مقاومت به علف‌کش فسفینوتریسین (سنتیل و همکاران، ۲۰۰٤) استفاده شده است. در مطالعات مختلف انتقال ژن‌های *gus* (سنتیل و همکاران، ۲۰۰٤)، *cry* (سانیال و همکاران، ۲۰۰۵) و بازدارنده آلفاآمیلاز (سرما و همکاران، ۲۰۰٤) به گیاه نخود انجام شده است. نتایج بررسی‌های مختلف نشان داده که درصد

1- Sunflower Seed Albumin
2- Glutamine syntheses

Archive of SID

www.SID.ir

تراریزش نخود در بیشتر مطالعات، بسیار پایین و حداکثر تا پنج درصد گزارش شده است و حداکثر تراریزش (۵/۱ درصد) با استفاده از عامل گزینشگر فسفینوتریسین در محیط کشت به‌دست آمده است (سنتیل و همکاران، ۲۰۰٤). در حالی که درصد تراریزش در محیط گزینشی حاوی کانامایسین پایین‌تر و بین ۰/٤ تا ۳ درصد بوده است (پولیستی و همکاران، ۱۹۹۷؛ کریشنامورتی و همکاران، ۲۰۰۰؛ سنتیل و همکاران، ۲۰۰٤؛ سانیال و همکاران، ۲۰۰۵). علاوه‌بر این استفاده از روش باززایی مستقیم و کاربرد کانامایسین در محیط گزینش گیاهان تراریخته باعث ایجاد گیاهان شیمر شده است (باروال و همکاران، ۱۹۸٦؛ کار و همکاران، ۱۹۹٦).

در این بررسی با هدف تعیین درصد تراریزش و انتقال ژن به نخود، از ژن گزارشگر ***gus*** و ژن گزینشگر ***bar*** به‌همراه ژن ***ssa*** استفاده شد تا ضمن تولید پروتئین SSA، کارایی تراریزش به کمک آگروباکتریوم تومی فاشینس به‌منظور انتقال ژن به نخود با استفاده از روش مستقیم باززایی یا شاخه زایی چندگانه مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

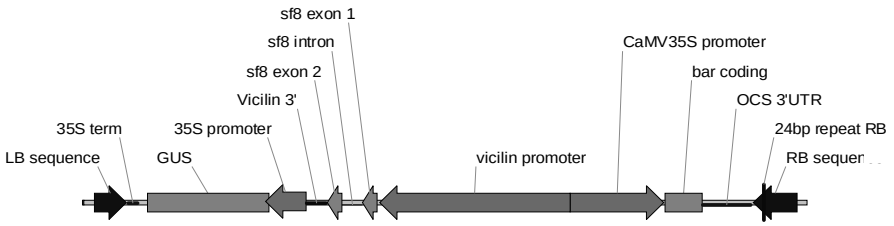
مواد گیاهی: در این بررسی از رقم Jimbour (تیپ دسی، رقم رایج در استرالیا) برای تولید نخود تراریخته استفاده شد. این رقم دارای ارتفاعی بلند، عملکرد ثابت و کیفیت خوب دانه می‌باشد که از بانک بذر مرکز تحقیقاتی سی‌اس‌آیرو[1] در استرالیا تهیه شد.

پلاسمید و باکتری: برای هم کشتی از آگروباکتریوم تومی فاشینس نژاد AGL1 که حاوی پلاسمید pBSF16 می‌باشد، استفاده شد. ژن‌های ***bar***، ***ssa*** و ***gus*** درون T-DNAی این پلاسمید تعبیه گردیده است (شکل ۱). این ژن‌ها به‌ترتیب رمزکننده فسفینوتریسین استیل ترانسفراز (مقاومت به علفکش فسفینوتریسین)، پروتئین ذخیره‌ای آفتابگردان و بتاگلوکورونیداز می‌باشند. ژن‌های ***bar*** و ***gus*** هر کدام تحت کنترل پیشبر 35S از ویروس موزائیک گل کلم و ژن ***ssa*** تحت یک پیشبر اختصاصی دانه از ژن ویسیلین از نخود فرنگی می‌باشد (مولویگ و همکاران، ۱۹۹۷). ژن شیمری اختصاصی دانه که پروتئین ذخیره‌ای آفتابگردان (SSA) را می‌سازد (کورت و همکاران، ۱۹۹۱)، از طریق جایگزینی ناحیه ژن رمزکننده ویسیلین در نخودفرنگی با ناحیه ژن رمزکننده ***ssa*** (حاوی دو اگزون به نام sf8 و یک اینترون sf8، شکل۱) از پلاسمید pSFg13 ساخته شده است (هیگینز و همکاران، ۱۹۸۸).

1- CSIRO

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- ساختار T-DNA (۱۰۷۹۳ جفت باز) حاوی ژن‌های *bar*، *gus* و *ssa*
(ژن *ssa* حاوی دو اگزون sf8 و یک اینترون sf8 می‌باشد).

تهیه ریزنمونه و هم کشتی با باکتری: ابتدا بذور استریل شده و سپس به‌مدت ۲٤ ساعت درون آب مقطر استریل قرار داده شدند تا کاملا متورم شوند. از محیط کشت MG/L حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین برای کشت آگروباکتریوم تومی‌فاشینس AGL1 استفاده شد. در پلاسمید این باکتری ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین تعبیه شده است و بنابراین از آن به جای آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین که برای بافت گیاهی ضرر دارد استفاده شد. باکتری درون محیط کشت MG/L به‌صورت شبانه در دما ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفت تا OD موردنیاز که بین نیم تا یک می‌باشد را تامین نماید.

در این آزمایش برای بررسی بیان ژن *gus* در مراحل مختلف از دو ریز نمونه شامل ۱- برش‌های طولی از محور جنینی همراه با لپه‌ها (۳۰۰ ریزنمونه) و ۲- برش‌های طولی از محور جنینی نوک‌زدایی شده و بدون لپه (۲۰۰ ریزنمونه) برای هم‌کشتی استفاده شد. ریزنمونه‌های آماده درون سوسپانسیون آگروباکتریوم به‌مدت ٤٥ دقیقه قرار داده شدند تا ریزنمونه‌ها در معرض باکتری قرار گیرند. پس از آن ریزنمونه‌ها روی کاغذ صافی، خشک و آبگیری شده و روی کاغذ صافی قرار داده شده در محیط هم‌کشتی جامد منتقل شدند. محیط هم‌کشتی شامل محیط B5 جامد به‌همراه ده میلی‌مولار MES[1]، یک میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید (NAA)، یک میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین (BAP) و صد میکرومولار از کونیفریل الکل بود. سپس محیط کشت حاوی ریزنمونه‌ها به‌منظور هم‌کشتی در اتاق رشد با دما ٢٤ درجه سانتی‌گراد و ١٦/٨ (تاریکی/روشنایی) به‌مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد.

محیط کشت باززایی و تشکیل شاخه: پس از سه روز ریزنمونه‌ها به محیط کشت باززایی و انتخاب

1- Methyl Ethan Sulfunate

Archive of SID

www.SID.ir

(محیط کشت RS) که شامل محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ده میلی‌مولار MES، ۵ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتریسین[1] و ۱۵۰میلی‌گرم در لیتر تیمنتین با pH معادل ۵/۸ می‌باشد، انتقال داده شدند. از تیمنتین برای حذف رشد باکتری استفاده شد. پس از دو هفته درصد ظهور شاخه محاسبه گردید. ریزنمونه‌ها قبل از انتقال به محیط کشت بعدی از لپه‌ها جداسازی شدند و نوک ریشه‌چه‌هایی که بر جای ماندند، حذف شدند و سپس به محیط کشت انتخابی بعدی (محیط کشت SS) شبیه محیط کشت RS ولی بدون NAA انتقال داده شدند. پس از دو هفته شاخه‌های زنده و پایه آن‌ها در محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر کینتین و ده میلی مولار MES، ۵ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتریسین و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تیمنتین (محیط کشت TS) به تعداد چند دوره واکشت شدند.

ریشه‌زایی و سازگاری: شاخه‌های باقی‌مانده برای ریشه‌زایی به محیط کشت MB (نمک‌های محیط کشت MS و ویتامین‌های محیط کشت B5) حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر IAA به اضافه ۵ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتریسین و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تیمنتین منتقل شدند. علاوه‌بر این برخی شاخه‌ها نیز روی گیاهچه‌های ٦ روزه پیوند زده شدند. به‌منظور سازگاری نیز در ابتدا شاخه‌های ریشه‌دار شده که طول ریشه آن‌ها بیش از یک سانتی‌متر بود به خاک سبک حاوی نسبت‌های مساوی از ماسه: مواد آلی: پرلیت (۱:۱:۱) انتقال داده شده و از ظروف شفاف پلاستیکی برای حفظ رطوبت گیاهچه‌ها استفاده شد. به‌تدریج مقدار رطوبت کم شده و بر مقدار نور افزوده شد. گیاهان پس از مدتی به گلخانه و سپس به گلدان‌های بزرگ‌تر منتقل شدند.

ارزیابی GUS: برای تهیه محلول GUS از دستورالعمل جفرسون (۱۹۸۷) استفاده شد و این ارزیابی در طی پنج مرحله انجام شد:

مرحله اول: سه روز پس از هم‌کشتی ریزنمونه‌ها در محیط کشت هم کشتی؛

مرحله دوم: دو هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت RS؛

مرحله سوم: دو هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت SS؛

مرحله چهارم: چهار هفته پس از انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت TS؛

مرحله پنجم: چهار هفته پس از انتقال گیاهان به گلخانه

1- Ppt

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه و تحلیل مولکولی گیاهان تراریخته با PCR: گیاهان سازگاریافته در گلخانه پس از ۸ هفته به‌منظور بررسی و تایید حضور ژن‌های *bar*، *gus* و *ssa*، به‌ترتیب با آغازگرهای مختص ژن‌های *bar*، *gus* و *ssa*: (5´TCAGCAGGTGGGTGTAGAGC 3´ و 5´ATTACCATGAGCCCAGAACG 3´) (5´CCCTTACGCTGAAGAGATGC 3´ و 5´AATAACGGTTCAGGCACAGC 3´) (5´ AGGTTTTCGATCGTGTTTGC3´ و 5´ CCACAGGCCATATAAATTTC 3´) مورد ارزیابی PCR قرار گرفتند. برای استخراج DNA ژنومی از روش Soltis Lab CTAB (دایل و دایل، ۱۹۸۷؛ کولینز، ۱۹۹۲) استفاده شد.

علاوه‌بر DNA گیاهان تراریخته از شاهدهای مناسب شامل DNA گیاهان غیرتراریخته، واکنش PCR بدون DNA و یک واکنش با DNA پلاسمیدی استفاده شد تا کنترل‌های مناسب در حین آزمایش انجام شود. دما اتصال برای ژن‌های *gus*، *bar* و *ssa* به‌ترتیب ۵۹، ۵۹/۵ و ۵۸ درجه سانتی‌گراد بود و مخلوط واکنش و برنامه حرارتی چرخه‌ها بر طبق روش استاندارد انجام شد. محصول واکنش PCR آن‌ها به‌ترتیب قطعات ٤١٠ جفت بازی، ٣٤٠ جفت بازی و ٥٠١ جفت بازی را تولید نمودند.

نتایج

شاخه‌زایی و ریشه‌زایی: دو هفته پس از هم کشتی، درصد شاخه‌زایی در ریزنمونه‌های نوع یک و دو تعیین شد. درصد شاخه‌زایی در ریزنمونه نوع یک (محور جنینی همراه با لپه) حدود ٦٠ درصد و در ریزنمونه نوع دوم (محور جنینی بدون لپه) کمتر از ۱۰ درصد بوده است. بنابراین حضور لپه‌ها برای درصد شاخه‌زایی بیشتر در ریزنمونه‌ها الزامی است.

شاخه‌های به‌دست آمده پس از گزینش‌های مکرر به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند و درصد ریشه‌زایی حدود ۳۷ درصد تعیین شد که این شاخه‌ها از استقرار مناسبی نیز در گلخانه برخوردار بودند اما در نمونه‌هایی که از روش پیوند زدن استفاده شده بود، تقریبا ۹۰ درصد شاخه‌ها بقا یافته و از رشد و بُنیه بهتری نسبت به شاخه‌های ریشه‌دار شده در محیط کشت برخوردار بودند.

ارزیابی GUS و تولید شاخه‌های تراریخته: در مرحله اول ارزیابی GUS، حدود ۱۲ ریزنمونه از هر نوع به‌طور تصادفی انتخاب شده و در محلول GUS قرار گرفتند. پس از شش ساعت لکه‌های آبی در مقطع محورهای جنینی ظاهر شد ولی ریزنمونه‌ها به‌صورت شبانه در محلول GUS باقی ماند تا تمام سلول‌های دریافت‌کننده ژن *gus*، رنگ آبی را تولید نمایند. از آن‌جایی که درون ژن *gus* یک اینترون

Archive of SID

www.SID.ir

تعبیه شده بود، بیان این ژن در باکتری مشاهده نشده و تنها در بافت گیاهی قابل رویت بود اما بیان ژن *gus* در این مرحله موقتی است (شکل ۲- الف).

شکل ۲- الف: فعالیت GUS در ریزنمونه محور جنینی در مراحل اولیه پس از هم کشتی و ب: آبی شدن شدید برگ گیاهان تراریخته در مقابل شاهد غیرتراریخته.

تمام ۱۲ ریزنمونه نوع یک مورد استفاده برای ارزیابی GUS، دارای لکه‌های آبی در محل برش بودند و در ریزنمونه دو نیز بین ۱۲ ریزنمونه، تنها دو ریزنمونه دارای لکه‌های آبی بود و بقیه ریزنمونه‌ها عملا رنگ آبی تولید نکردند.

در مرحله دوم ارزیابی GUS نیز حدود ۱۲ ریزنمونه از هر نوع به‌همراه شاخه‌های ظاهر شده آن‌ها برای ارزیابی GUS مورد بررسی قرار گرفتند ولی در این مرحله در هیچ یک از ریزنمونه‌ها، فعالیت و بیان ژن *gus* مشاهده نگردید. بنابراین شاخه‌هایی که پس از دو هفته در ریزنمونه‌ها ظاهر شدند، شاخه‌های تراریخته نبودند. زیرا این زمان محورهای جنینی به لپه‌ها اتصال داشتند و عملا هر شاخه‌ای می‌توانست بقا و رشد داشته باشد.

در مرحله سوم نیز ۱۵ شاخه ظاهر شده در محیط کشت SS به تصادف انتخاب شد و برای ارزیابی GUS مورد بررسی قرار گرفت. در ریزنمونه نوع یک از بین ۱۵ ریزنمونه تنها یک ریزنمونه، لکه‌های آبی از خود نشان داد و در ریزنمونه نوع دو هیچ کدام از ریزنمونه‌ها رنگ آبی تولید نکردند و تقریبا تمام ریزنمونه‌ها از بین رفتند.

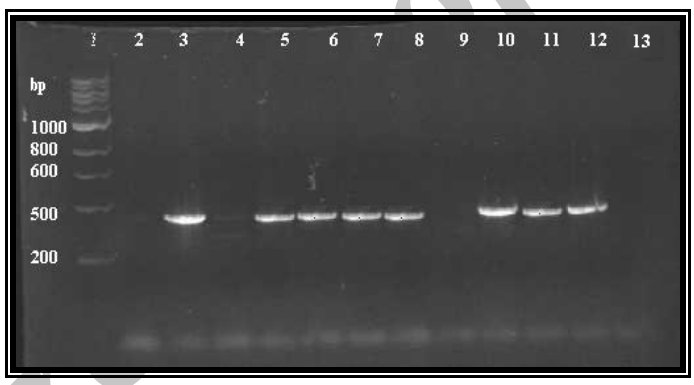
در مجموع در محیط کشت SS، بیشتر شاخه‌هایی که در مرحله قبل ظهور یافته بودند، قهوه‌ای شده و از بین رفتند. سپس ریزنمونه‌های سبز و شاخه‌های سبز دوباره به محیط کشت TS انتقال یافتند. از ۳۰۰ ریزنمونه نوع یک حدود ۱۲۲ ریزنمونه بقاء داشتند و سبز بودند و به محیط کشت TS انتقال یافتند.

Archive of SID

www.SID.ir

شاخه‌های سبز و پایه‌ها طی دو واکشت ١٤ روزه به محیط کشت TS منتقل شدند و سپس شاخه‌های سبز بر جای مانده در انتها چرخه دوم، مورد ارزیابی GUS قرار گرفتند. در ریزنمونه نوع یک تنها ٢٤ شاخه و پایه آن‌ها به واکشت دوم در محیط کشت TS منتقل گردیدند. پس از دو هفته تنها هفت شاخه و پایه آن‌ها زنده ماندند که به محیط کشت TS منتقل گردیدند و از این شاخه‌ها، نمونه برگی برای ارزیابی GUS در مرحله چهارم، استفاده گردید که در دو شاخه رنگ آبی ظاهر شد (شکل ٢- ب). سپس شاخه‌ها و پایه آن‌ها به محیط کشت جدید TS حاوی پنج میلی‌گرم در لیتر فسفینوتریسین منتقل شدند تا شاخه‌های بیشتری رشد کرده و تکثیر یابند. گیاهچه‌های به‌دست آمده پس از سازگاری و چهار هفته رشد درون گلخانه، مورد ارزیابی GUS در مرحله پنجم قرار گرفتند که از ١٤ گیاه به‌دست آمده در گلخانه حدود ١٣ گیاه نتاج مثبتی در ارزیابی GUS نشان دادند (جدول ١).

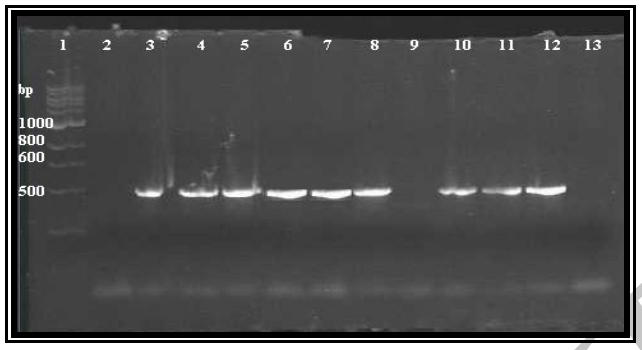
تجزیه و تحلیل PCR: تجزیه و تحلیل مولکولی PCR بر روی ١٤ گیاه به‌دست آمده در گلخانه (شکل‌های ٣، ٤ و ٥) انجام گرفت که نتایج به‌دست آمده در این مرحله در جدول ١ خلاصه شده است.



شکل ٣- تکثیر باند ٤١٠ جفت بازی مربوط به ژن *gus* در برخی نمونه‌های مثبت.

(١- سایز مارکر، ٢- آب، ٣- E16-G-1، ٤- E16-G-4، ٥- E16-G-2، ٦- E16-F-1، ٧- E16-F-2، ٨- E16-E-1، ٩- E16-G-4، ١٠- E16-E-3، ١١- E16-E-2، ١٢- پلاسمید pBSF16، ١٣- شاهد غیرتراریخته)

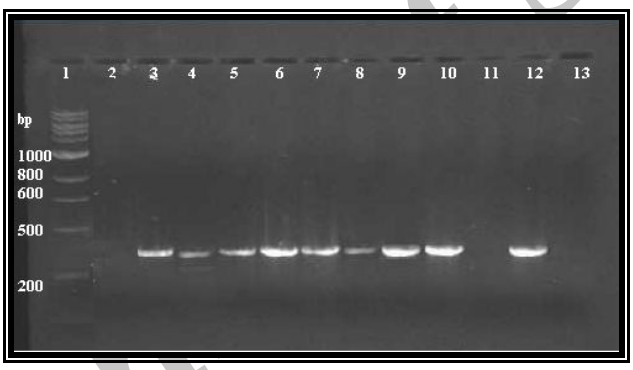
www.SID.ir



۵۰۱ bp

شکل ٤- تکثیر باند ۵۰۱ جفت بازی مربوط به ژن *ssa* در برخی نمونه‌های مثبت.

(۱- سایز مارکر، ۲- آب، ۳- E16-G-1، ٤- E16-G-5، ٥- E16-G-2، ٦- E16-F-1، ۷- E16-F-2، ۸- E16-E-1، ۹- E16-G-4، ۱۰- E16-E-3، ۱۱- E16-E-2، ۱۲- پلاسمید pBSF16، ۱۳- شاهد غیرتراریخته)



۳٤۰ bp

شکل ۵ - تکثیر باند ۳٤۰ جفت بازی مربوط به ژن *bar* در برخی نمونه‌های مثبت.

(۱- سایز مارکر، ۲- آب، ۳- E16-G-1، ٤- E16-G-5، ٥- E16-G-2، ٦- E16-F-1، ۷- E16-F-2، ۸- E16-E-1، ۹- E16-E-2، ۱۰- E16-E-3، ۱۱- E16-G-4، ۱۲- پلاسمید pBSF16، ۱۳- شاهد غیرتراریخته).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- نتایج ارزیابی فعالیت GUS و PCR با آغازگرهای *gus*، *ssa* و *bar*

لاین	ارزیابی فعالیت GUS	سیستم ریشه‌زایی	PCR		
			ژن *gus*	ژن *ssa*	ژن *bar*
E16-G-1	-	محیط کشت	+	+	+
E16-G-2	+	محیط کشت	+	+	+
E16-E-1	+	محیط کشت	+	+	+
E16-E-2	+	محیط کشت	+	+	+
E16-E-3	+	محیط کشت	+	+	+
E16-F-1	-	محیط کشت	+	+	+
E16-F-2	-	محیط کشت	+	+	+
E16-G-3	بسیار ضعیف	پیوند زدن	+	+	+
E16-G-4	-	پیوند زدن	–	–	–
E16-D-1	بسیار ضعیف	محیط کشت	+	+	+
E16-D-2	+	محیط کشت	+	+	+
E16-G-5	+	محیط کشت	+	+	+
E16-E-4	+	محیط کشت	+	+	+
E16-F-3	-	محیط کشت	+	+	+

از ١٤ گیاه به‌دست آمده در گلخانه، ١٣ گیاه حاوی ژن‌های ***gus***، ***ssa*** و ***bar*** بودند و از این ١٣ گیاه در ٩ مورد فعالیت GUS مشاهده شده است. در ٤ گیاه نیز فعالیت GUS مشاهده نگردید که یکی از دلایل خاموشی و عدم بیان این ژن ممکن است به‌علت برهمکنش بین پیشبرهای 35SCaMV باشد که برای هر دو ژن ***gus*** و***bar*** استفاده شده است. از طرفی ژن ***gus*** ممکن است به ناحیه‌ای از ژنوم وارد شده که به دلایلی نمی‌تواند بیان شود و خاموش شده است.

از ٥٠٠ ریزنمونه کشت شده در ابتدا آزمایش تنها ١٣ گیاه تراریخته به‌دست آمد که دارای جواب مثبتی در PCR بودند. این ١٣ گیاه تراریخته از چهار ریزنمونه اولیه به‌دست آمده‌اند که مربوط به ریزنمونه یک بوده‌اند. بنابراین درصد تراریزش برای این چهار واقعه مستقل برابر با ١/٣ درصد برای کل این آزمایش بوده است. در صورتی که ١٣ گیاه تراریخته از ٣٠٠ ریزنمونه اولیه بدون احتساب منشا ریزنمونه در نظر گرفته شوند، درصد تراریزش در این آزمایش برابر ٤/٣ درصد بوده است. البته اگر تعداد بذر مورد استفاده موردنظر قرار گیرد، میزان تراریزش بیشتر خواهد شد و برابر با ٨/٦ درصد

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشد. البته در منابع به چگونگی نحوه محاسبه درصد تراریزش به‌ازای هر بذر یا هر ریزنمونه (نصف بذر) اشاره‌ای نشده است.

بحث

اصلاح بقولات دانه‌ای به‌منظور تولید پروتئین‌های غنی از سیستئین و متیونین می‌تواند بر ارزش تغذیه‌ای این محصولات بیفزاید. یکی از این مسیرها انتقال ژن عامل سنتز پروتئین‌های غنی از سیستئین و متیونین نظیر پروتئین‌های ذخیره‌ای از منابع گیاهی دیگر مثل آفتابگردان به نخود می‌باشد. نتایج این بررسی نیز نشان داد که ژن *ssa* از آفتابگردان با موفقیت در بذور نخود بیان شده است. بیان این ژن باعث افزایش تولید اسیدآمینه‌های سولفوردار نظیر متیونین و سیستئین در نخود می‌شود. البته توصیه می‌شود که پروتئین بیان شده از نظر دارا بودن این اسیدآمینه‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار بگیرد. انتقال ژن *ssa* به نخودفرنگی توانسته سبب افزایش کیفیت پروتئین دانه نخودفرنگی شود (مولویگ و همکاران، ۱۹۹۷).

بخش دیگری از نتایج این بررسی نشان داد که می‌توان از ژن *gus* برای تعیین درصد تراریزش و بهینه‌سازی فرایند انتقال ژن به نخود استفاده نمود. با توجه به این‌که درصد تراریزش در این گیاه به‌علت سختی باززایی و روش مستقیم شاخه‌زایی چندگانه بسیار پائین است، بنابراین حصول گیاهان مطلوب‌تراریخته نیاز به کار بیشتری در کشت بافت دارد. علاوه‌بر این تغییر روش باززایی و تراریزش نیز می‌تواند از گزینه‌های دیگری برای بهبود فرایند تراریزش در این گیاه باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از ژن گزینشگر *bar* می‌تواند نسبت به ژن *nptII* دارای ارجحیت باشد. زیرا هم درصد تراریزش بالاتر است و هم این‌که گزینش بهتری بر روی گیاهان تراریخته در حین فرایند انتقال انجام می‌شود. گیاهان حاوی ژن *bar* نسبت به علف‌کش فسفینوتریسین بسیار مقاوم بوده و سبز می‌باشند و شاخه‌های غیرتراریخته نمی‌توانند بقا یابند و به سرعت قهوه‌ای شده و از بین می‌روند. تجربیات شخصی نگارنده نشان می‌دهد زمانی‌که از ژن *nptII* استفاده شود میزان فرار زیاد خواهد بود و درصد زیادی از گیاهان بقا یافته ممکن است حاوی این ژن نباشند و به دلایل دیگری دارای مقاومت نسبت به کانامایسین باشند. بنابراین گزینش گیاهان تراریخته با مشکل همراه خواهد بود (مشتاقی، ۲۰۰۸). کار و همکاران (۱۹۹۶) از محیط کشت MS با افزایش غلظت تدریجی کانامایسین در محیط کشت (۲۵ ← ۵۰ ← ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین) برای گزینش شاخه‌های تراریخته استفاده نمودند.

Archive of SID

www.SID.ir

شاخه‌های به‌دست آمده دارای حالت شیمر (قسمت‌های سبز و سفید) بودند. باروال و همکاران (۱۹۸٦) نیز گزارش کرده است که احتمال باززایی گیاهان شیمر با روش باززایی مستقیم در محیط کشت حاوی کانامایسین وجود دارد که گیاهان غیرتراریخته با گزینش مکرر شاخه‌های چندگانه حذف می‌شوند. در حالی که نتایج این بررسی نشان داد که در محیط کشت حاوی فسفینوتریسین، احتمال باززایی و فرار گیاهان غیرتراریخته بسیار پایین می‌باشد.

علاوه‌بر این پیوندزدن شاخه‌های تراریخته نسبت به ریشه‌زایی آن‌ها در محیط کشت برتری دارد. زیرا اگر پیوندزدن با موفقیت انجام شود، گیاهان به‌دست آمده از بُنیه بیشتر و بهتری برخوردار هستند و می‌توانند سریع‌تر در گلخانه و خاک استقرار یابند و میزان بذر بیشتری نیز تولید کنند (مشتاقی، ۱۳۸۷). در حالی که درصد ریشه‌زایی در محیط کشت پایین‌تر است و تعدادی شاخه که ممکن است تراریخته باشند، به‌دلیل عدم ریشه‌زایی از دست می‌روند. از طرفی سازگاری گیاهان ریشه‌دار شده نیز مشکل است و درصدی از گیاهچه‌ها نیز در این مرحله از دست خواهند رفت. علاوه‌بر این گیاهان بقا یافته از بُنیه ضعیف‌تری برخوردارند و ممکن است برخی قادر به تولید بذر نباشند و یا میزان تولید بذر در آن‌ها بسیار پایین باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده در این آزمایش و مقایسه آن با نتایج دیگران می‌توان گفت که گیاه نخود نیز مانند سایر بقولات از سرسختی بالایی در باززایی و تراریزش برخوردار است. کار و همکاران (۱۹۹٦) درصد تراریزش نخود را بین یک تا ۱/۵ درصد، سانیال و همکاران (۲۰۰۵) ۱/۱۲ درصد، پولیسیتی و همکاران (۱۹۹۷) ۳/۱ درصد و سنتیل و همکاران (۲۰۰٤) حدود پنج درصد برآورد کرده‌اند. این بررسی نیز نشان داد که می‌توان با استفاده از یک ژن گزینشگر مناسب میزان درصد تراریزش را در این گیاه تا چهار الی هشت درصد بالا برد. به‌طوری که سنتیل و همکاران (۲۰۰٤) در بررسی خود نیز از ژن گزینشگر *bar* استفاده نموده و به سطح بالاتری از تراریزش حدود پنج درصد دست یافته‌اند. در ادامه این پژوهش نیز، بررسی تمام بذور و لاین‌ها از نظر میزان بیان ژن *ssa* و تعیین درصد تفرق این ژن در نسل T1 و نسل‌های بعدی و همچنین اندازه‌گیری میزان تولید اسیدآمینه‌های سولفوردار در این گیاه توصیه می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Bagheri, A., Moshtaghi, N., and Sharifi, A. 2007. Plant Biotechnology. Mashhad Jehad Daneshgahi Press. 235p. (In Persian)
2. Barwal, U.B., Kerns, H.R., and Widholm, J.M. 1986. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis. Planta. 167: 473-481.
3. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
4. Cullings, K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Mol Ecol. 1: 233-240.
5. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin. 19: 11-15.
6. Higgins, T.J.V., Newbigin, E.J., Spencer, D., Llewellyn, D.J., and Craig, S. 1988. The sequence of a pea *vicilin* gene and its expression in transgenic tobacco plants. Plant Mol. Biol. 11: 683-695.
7. Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405.
8. Kar, S., Johnson, T.M., Nayak, P., and Sen, S.K. 1996. Efficient transgenic plant regeneration through *agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 16: 32-37.
9. Kortt, A.A., Caldwell, J.B., Lilley, G.G., and Higgins, T.J.V. 1991. Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S protein from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) Eur. J. Biochem. 195: 329-334.
10. Krishnamurthy, K.V., Suhasini, K., Sagare, A.P., Meixner, M., Dekathen, A., Pikardt, T., and Schieder, O. 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. Plant Cell Rep. 19: 235-240.
11. Molvig, L., Tabe, L.M., Eggum, B.O., Moore, A.E., Craig, S., Spencer, D., and Higgins, T.J.V. 1997. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 8393-8398.
12. Moshtaghi, N. 2008. Genetic engineering of chickpea (*Cicer arietinum* L.) for increasing tolerance to pod borer and freezing stress. Ph.D Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. Iran. 126p.
13. Polisetty, R., Paul, V., Deveshvar, J.J., Khetarpal, S., Suresh K., and Chandra, R. 1997. Multiple shoot induction by benzyladenine and complete plant regeneration from seed explants of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Reports. 16: 565-571.
14. Purohit, S.S. 2003. Agricultural Biotechnology. Agrobios. India. 600p.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Sanyal, I., Singh, A.K., Kaushik, M., and Amla, D.V. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera*. Plant Sci. 168: 1135-1146.
16. Sarmah, B.K., Moore, A., Tate, W., Molvig, L., Morton, R.L., Rees, D.P., Chiaiese, P., Chrispeels, M.J., Tabe, L.M., and Higgins, T.J.V. 2004. Transgenic chickpea seeds expressing high level of a bean α-amylase inhibitor. Mol. Breed. 14: 73-82.
17. Senthil, G., Williamson, B., Dinkins, R.D., and Ramsay, G. 2004. An efficient transformation system for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Plant Cell Rep. 23: 297-303.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 19(1), 2012
http://jopp.gau.ac.ir

Genetic engineering of chickpea (*Cicer arietinum* L.) For improvement of seed protein

[*]N. Moshtaghi[1], A. Bagheri[1], M. Jalali Javaran[2] and B. Ghareyazie[3]
[1]Faculty of Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad, [2]Faculty of Agricultural College, Tarbiat Modares University, Tehran, [3]Faculty of Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj
Received: 2009-8-3; Accepted: 2012-3-2

Abstract

Protein of legume grains has deficiency for sulfur aminoacids such as methionin and systein. So improvement of protein quality is an important goal in pulse breeding. We have used *gus* reporter gene to determine transformation percentage, *ssa* gene for proteins rich of systein and methionin, and *bar* gene for selection of transgenic plants. PCR analysis was used to confirm the transformation of putative transgenic plants in glasshouse. Gus assessment has been done in five stages. *bar* gene is a suitable selectable marker for obtaining transgenic plants and high transformation percentage in rapid rate. PCR results showed that 13 plants have had *gus, ssa* and *bar* genes. Transformation percentage was 4.3 %. Low rooting and establishment of shoots in glasshouse is one of the reasons for low transformation percentages. So, grafting instead of *in vitro* rooting is a good alternative.

Keywords: Chickpea; Transformation; Sulfur aminoacids; Ssa and gus

[*]Coresponding Author; Email:moshtaghi@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir